

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

3 3

(11)Publication number : 64-047435

(43)Date of publication of application : 21.02.1989

(51)Int.Cl.

B01F 17/38

B01F 17/22

G01N 33/68

(21)Application number : 62-203529

(71)Applicant : ORIENTAL YEAST CO LTD

(22)Date of filing : 18.08.1987

(72)Inventor : MATSUO TAKESHI
NISHI NOZOMI
WADA FUMIO
KOKAWARA ISAMU

(54) DISPERSANT FOR BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To prevent biological active peptide from adhering, by preparing a dispersant with effective component such as 3-[(3-colamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate.

CONSTITUTION: The dispersant for biologically active peptide is prepared by using 3-[(3-colamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (hereinafter referred to as CHAPS) or 3-[(3-colamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (hereinafter referred to as CHAPSO) as effective component. The amount of CHAPS or CHAPSO to be added is about 0.05W1.0wt.% to the amount of a liq. contg. the biologically active peptide. The biologically active peptide in the soln. added with CHAPS or CHAPSO is dispersed well and thereby, the adhesion of the biologically active peptide to the wall of utensils and measuring apparata is remarkably reduced.

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-47435

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)2月21日

B 01 F 17/38

8317-4G

17/22

8317-4G

G 01 N 33/68

8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 生物活性ペプチド分散剤

⑯ 特 願 昭62-203529

⑰ 出 願 昭62(1987)8月18日

⑱ 発 明 者 松 尾 雄 志 香川県木田郡三木町平木640-9

⑲ 発 明 者 西 望 香川県高松市前田東町505-2 A-208

⑳ 発 明 者 和 田 文 雄 香川県高松市前田東町505-2 D-203

㉑ 発 明 者 高 河 原 勇 兵庫県川西市大和東5-7-13

㉒ 出 願 人 オリエンタル酵母工業株式会社 東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号

㉓ 代 理 人 弁理士 戸田 親男

明 細 書

1. 発明の名称

生物活性ペプチド分散剤

2. 特許請求の範囲

- (1) 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート又は3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネートを有効成分とする生物活性ペプチド分散剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)(以下、CHAPSという)又は3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート(3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate)(以下、CHAPSOという)を有効成分とする生物活性ペプチド分散剤に関するものである。

本発明において、ごく微量の CHAPS又はCHAPSOを存在させれば、生化学の反応等において、生物活性ペプチドが器壁や測定器具並びにクロマト担体に吸着されてしまって反応に関与しなくなったり、精製されなくなったりするのを防止することができるので、生化学界、医薬界に益するところ大なるものがある。

(発明が解決しようとする問題点及び従来技術)

一般に、FGF(fibroblast growth factor)等の生物活性因子はペプチドからなり、ごく微量でその活性を発揮するところから、普通、反応や試験に用いられる生物活性ペプチドの量は著しく低濃度である。

そして、この超低濃度で用いられる生物活性ペプチドが反応や試験に用いる容器の壁や器具の内面に吸着されてしまって、反応に関与しなくなるのである。

生物活性ペプチドが器壁や器具に吸着されてしまったのでは、反応液中のペプチドの濃度が変化して、正しい測定結果が得られないという問題が

生じるのである。

そこで、従来は、生物活性ペプチド含有液に、血清アルブミンのような培養細胞に対して不活性で、比較的高純度の標品が得やすい物質を選んで、添加されていたのである。

しかしながら、血清アルブミン等の添加は生物活性ペプチドの安定化作用は認められても、生物活性因子そのものの物理化学的性状を調べる上で障害となり、また、生物活性ペプチド製品を製造する際に純度を大巾に低下させるという欠点があるのである。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、生物活性ペプチドとは全く性質を異にし、培養細胞に対する毒性が少なく、よりすぐれた生物活性ペプチド分散剤を求めて鋭意研究したところ、CHAPS 又は CHAPSO を使用することによって解決できたものである。

本発明は、CHAPS 又は CHAPSO を有効成分とする生物活性ペプチド分散剤に関するものである。

CHAPS 又は CHAPSO は両イオン界面活性剤の 1

種で公知のものであるが、CHAPS 又は CHAPSO が生物活性ペプチドの分散剤として有用であることは全く知られていない。

CHAPS 又は CHAPSO の添加量は、生物活性ペプチド含有液に対して、0.05~1.0%、好ましくは 0.1% 程度で十分である。

CHAPS 又は CHAPSO が添加された溶液中の生物活性ペプチドはよく分散され、器壁や測定器具に吸着されることが著しく低減される。例えば、生物活性ペプチド溶液を種々のクロマトカラムにかける際に、CHAPS 又は CHAPSO を添加しておけば、回収率は顕著に高まるものである。

また、CHAPS 又は CHAPSO を添加しておけば、生物活性ペプチドを透析するに際して透析膜への吸着はほとんど阻止できるものである。

また、CHAPS 又は CHAPSO の添加によって、溶液中の生物活性ペプチドは低温乃至は凍結状態で長期間安定に保存されるものである。

また、添加した CHAPS 又は CHAPSO は必要に応じて除去できるので有利である。

- 3 -

即ち、有機溶媒に対する溶解度の差を利用するものであるが、CHAPS 又は CHAPSO は水、メタノール、及びジメチルスルホキシドに可溶であるが、これ以外の溶媒（アセトン、アセトニトリル、エーテル、クロロホルム、2-メチル-1-プロパノール、N, N-ジメチルホルムアミド、イソアミルアルコール、エタノール、ヘキサン、キシレン、石油エーテル、ベンゼン、n-ヘプタン、トルエン）には溶けないので、この溶解度の差を利用して、容易に CHAPS 又は CHAPSO を分離することができる。

また、Heparin-Sepharose に吸着される生物活性ペプチドはこれを利用して、これに吸着されない CHAPS 又は CHAPSO を除去できる。さらに、逆相クロマトグラフィーによっても除去することができる。

次に、本発明の実施例を示す。なお、試料の DNA 合成活性あるいは FGF 活性は実施例 1 に示す方法で行い $\text{cpm} \times 10^{-4} / \text{well} / 3\text{h}$ で表示した。
実施例 1

- 4 -

BALB/3T3 繊維芽細胞を仔牛血清培地で 24 穴プレートで培養する際、CHAPS、NOG(1-O-n-octyl- β -D-glucopyranoside)、SB12(3-(dodecylmethyl ammonio)-1-propane sulfonate : sulfobetaine 12)、Triton X-100 及び NP-40(Nonidet P-40)を $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-1} \%$ まで添加し、19 日間培養後 DNA 合成活性を測定し、第 1 図の結果を得た。

第 1 図から種々の界面活性剤の中で両イオン界面活性剤の一種、CHAPS、が最も細胞毒性が弱いことが分る。

CHAPSO を用いて同様の試験を行い、同様の結果を得た。

(測定法)

マウス胎児から樹立された繊維芽細胞の一種 BALB/3T3 細胞を $2 \times 10^4 / \text{ml}$ 濃度で 3% 仔牛血清含有 DNA 培地 (DME-3% CS) に懸濁し、この 1 ml を 24 穴の多孔培養皿で 37℃ で 5 時間培養する。次いで、培地を 1 ml の DME-1% CS で置きかえ、37℃ で 48 時間培養し、試料 ($2 \sim 20 \mu\text{l}$) を添加し、さらに 16 時間培養する。

次いで、 $10\mu\text{Ci}$ の $2\times 10^{-5}\text{M}$ [^3H]チミジン($40\mu\text{Ci}/\text{ml}$)を添加し、3時間培養後DNA画分に取り込まれた放射能を測定する。即ち、培地を除去した後、細胞を 1ml のPBSで一度、 1ml の冷 10% TCAで3回洗浄する。次いで、 1ml の 0.5M NaOHを加え、室温で15分間放置後混合し、 5M HClで中和し、 6ml のシンチレーターカクテルを添加し、放射能を測定する。

実施例2

AT-3 prostatic adenocarcinoma 細胞を実施例1と同様に、CHAPSを添加して培養し、19時間後FGF活性を測定し、第2図の結果を得た。

また、CHAPS0を用いて同様の結果を得た。

実施例3

MC 3T3-E1骨芽細胞を実施例1と同様に、CHAPSを添加して培養し、19時間後FGF活性を $\text{cpm}\times 10^{-4}/\text{well}/3\text{h}$ で測定し、表1の結果を得た。

実施例4

市販のFGF(fibroblast growth factor)を $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ (PBS;phosphate buffered saline)として、

表1の各容器に入れ、 0.1% CHAPSを添加したものとし、 4°C にて2日間保存後に、各容器中のFGF活性を測定し、表1の結果を得た。

表1 FGFの容器への吸着：容器の種類とCHAPSによる安定化

容器の種類	FGF活性($\text{cpm}\times 10^{-3}/\text{well}/3\text{h}$)	
	-CHAPS	+ 0.1% CHAPS
ガラス製試験管	4.3	23.4
シリコン処理ガラス試験管	2.3	16.1
Minisorp試験管	15.7	31.6
プラスチック試験管(ポリスチレン製)	2.5	24.0

表1から 0.1% CHAPSの添加によってFGFの容器への吸着が効果的に防止されるのが分る。

実施例4

市販のFGFを表2の各濃度(PBS)として、それぞれガラス製試験管に入れ、すべてCHAPS無添加とし、 4°C で2日間保存後に、各容器中のFGF活性を測定し、表2の結果を得た。尚、活性測定はす

- 7 -

べて $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で行った。

表2 FGFの種々の濃度でのガラス容器への吸着の差

FGF濃度	FGF活性($\text{cpm}\times 10^{-4}/\text{well}/3\text{h}$)
$10\mu\text{g}/\text{ml}$	16.8
$5\mu\text{g}/\text{ml}$	2.5
$1\mu\text{g}/\text{ml}$	1.1
$0.5\mu\text{g}/\text{ml}$	0.7

表1と2の結果からFGF $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の高濃度でも 0.1% CHAPSが存在しない場合は、吸着による損失が30~40%の範囲で起ることが分る。

実施例5

市販のFGFを $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ (PBS)濃度で、 4°C にて表3の各濃度のCHAPS共存下で20時間透析した。透析後は全ての試料にCHAPS(0.1%)を添加し、容器に移し、各容器中のFGF活性を測定し、表3の結果を得た。透析膜はSPECTRAPOR($3,500\text{ cut off}$)を使用した。

- 8 -

表3 FGFの透析中に起こる損失とCHAPSによる安定化

CHAPS(%)	FGF活性($\text{cpm}\times 10^{-4}/\text{well}/3\text{h}$)
0	9.2
0.01	33.6
0.1	38.6

実施例6

市販のFGFを $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ (PBS)濃度で、第4図の各濃度でCHAPSを添加して、それぞれガラス製試験管で、 4°C で18日間保存し、各容器のFGF活性を $\text{cpm}\times 10^{-4}/\text{well}/3\text{h}$ で追跡測定し、第4図の結果を得た。

第4図から 0.1% CHAPS添加により $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のFGFを 4°C で11日間安定に保存できることが分る。

CHAPS0を用いて同様の結果を得た。

実施例7

市販FGF($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$)を種々の濃度のCHAPS共存下に -20°C でガラス容器中に保存した。試料は測

定のつど融解し、その一部についてFGF活性を測定した。

その結果は表4に示される。

表4 -20℃におけるFGFの保存に及ぼすCHAPSの安定化効果

-20℃で の日数	FGF活性($\text{cpm} \times 10^{-3}/\text{well}/3\text{h}$)			
	+CHAPS(%)			
	0	0.001	0.01	0.1
0	15.1	24.1	27.5	25.9
	14.3	25.3	30.0	28.7
7	6.5	29.1	35.0	26.3
	6.4	27.0	30.3	23.8
20	0.3	30.1	31.3	29.3
	0.5	29.3	36.4	23.4
40	0.6	18.5	23.5	24.8
	0.8	16.6	22.7	27.2

実施例8

市販FGF($5 \mu\text{g}/\text{ml}$)に1%CHAPS添加、無添加について50℃で60分放置し、FGFの安定性をみた。FGF

活性は $\text{cpm} \times 10^{-3}/\text{well}/3\text{h}$ で表示した。

結果は第5図に示されるが、これからCHAPSはFGFの熱不安定性に対しても安定化効果を示すことが分る。

実施例9

0.1%CHAPS添加と無添加とにおける塩基性FGF(bFGF)の粗標品の分子篩クロマトにおける溶出量を比較したのが第6図に示される。

第6図からCHAPS無添加の場合、bFGFがクロマト担体及び器具にかなり吸着されているのが分る。

実施例10

CHAPS無添加でヒト前立腺肥大症(benign prostatic hypertrophy; BPH)組織の抽出物をヘパリン5PW高速液クロ(HPLC)にかけたときのbFGF活性の溶出曲線を第7図に示す。

0.1%CHAPS添加でBPH組織の抽出物をヘパリン5PW高速液クロ(HPLC)にかけたときのbFGF活性の溶出曲線を第8図に示す。

第7図と第8図の比較から、CHAPSの添加がbFGFのクロマト担体及び器具への吸着を防止し

- 11 -

ているのが分る。

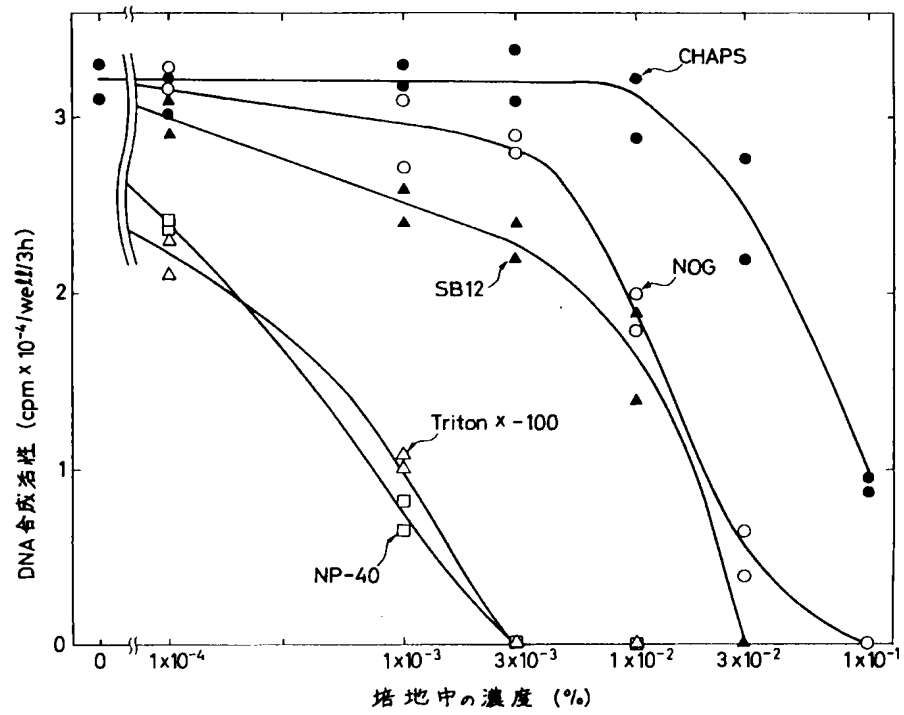
4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1で各分散剤による細胞毒性をみた図で、第2図は実施例2でCHAPS添加による細胞毒性をみた図で、第3図は実施例3でCHAPS添加による細胞毒性をみた図で、第4図は実施例6でCHAPSの各濃度によるFGFの吸着防止をみた図で、第5図は実施例8でCHAPS添加、無添加で50℃によるFGFの影響をみた図で、第6図は実施例9でCHAPS添加、無添加における分子篩クロマトにおけるBASKの吸着の影響をみた図で、第7図は実施例10でCHAPS無添加でBALBをHPLCにかけた図で、第8図はCHAPS添加でBALBをHPLCにかけた図である。

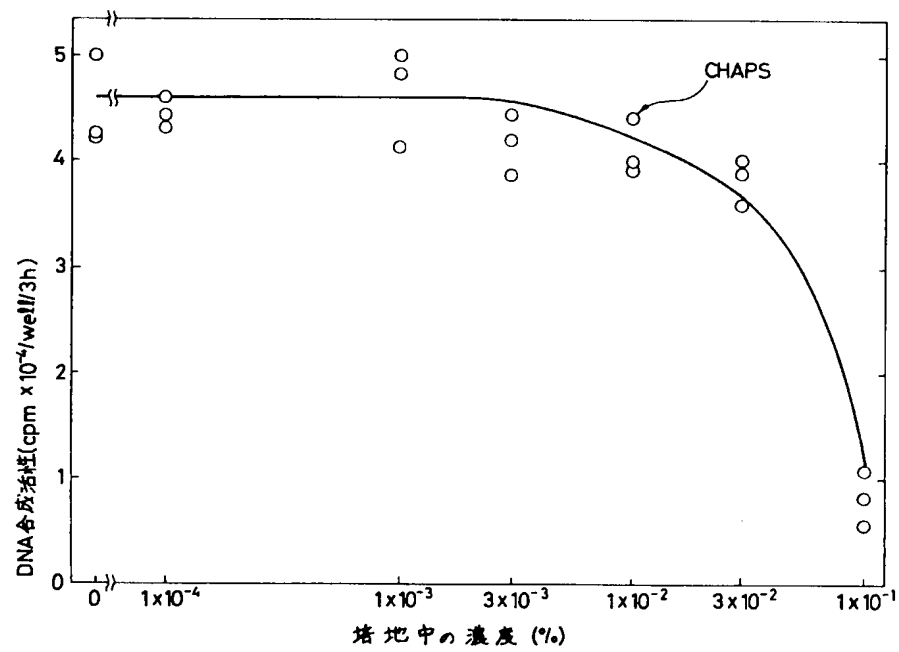
代理人 井理士 戸田 親 男

- 12 -

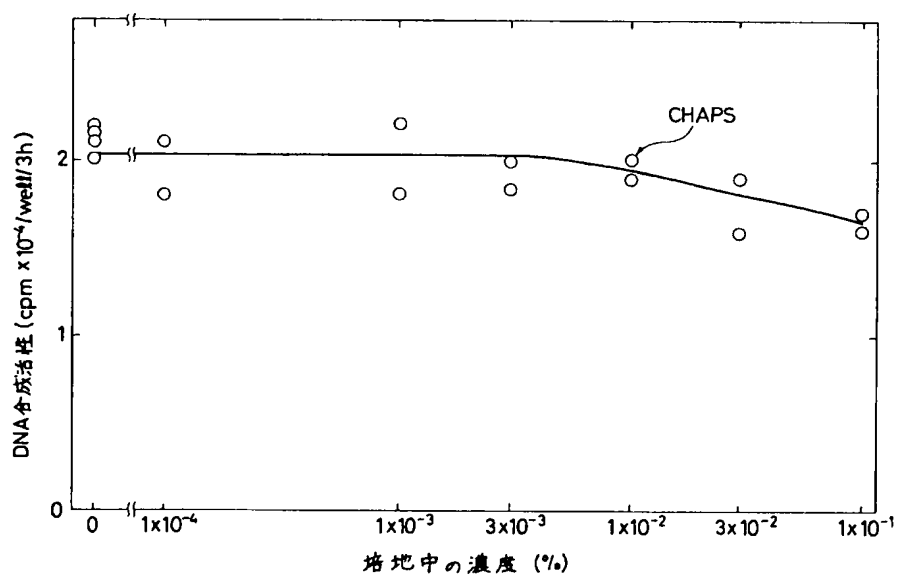
第 1 図



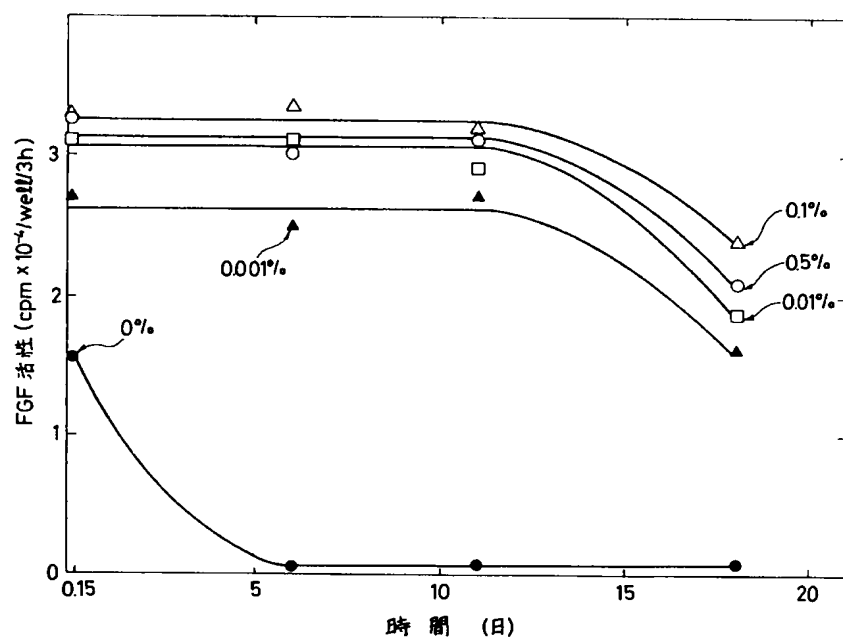
第 2 図



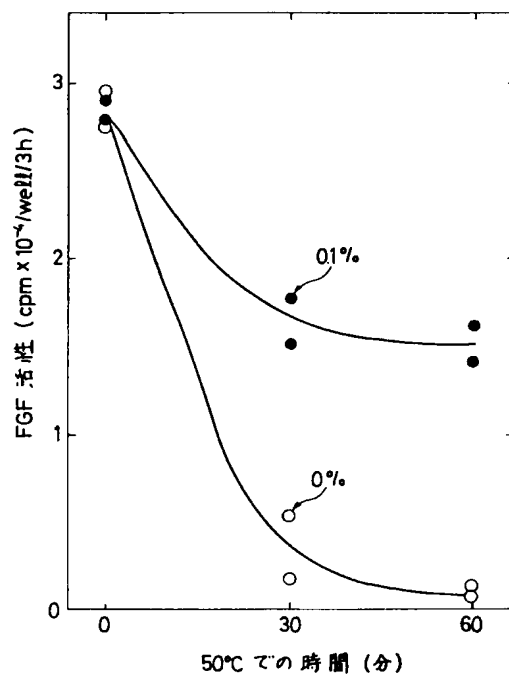
第 3 図



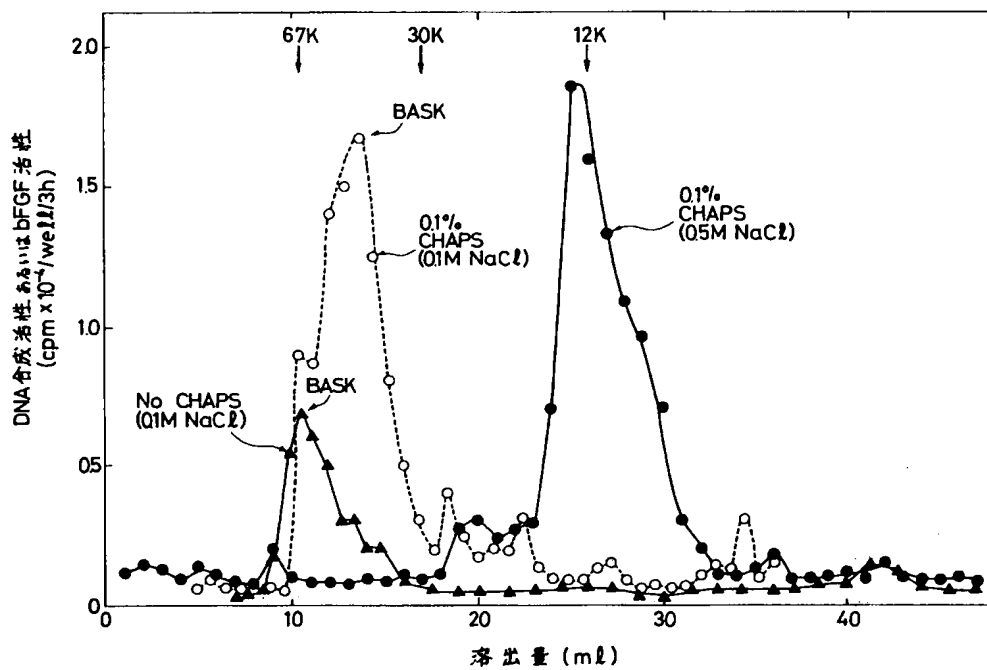
第 4 図



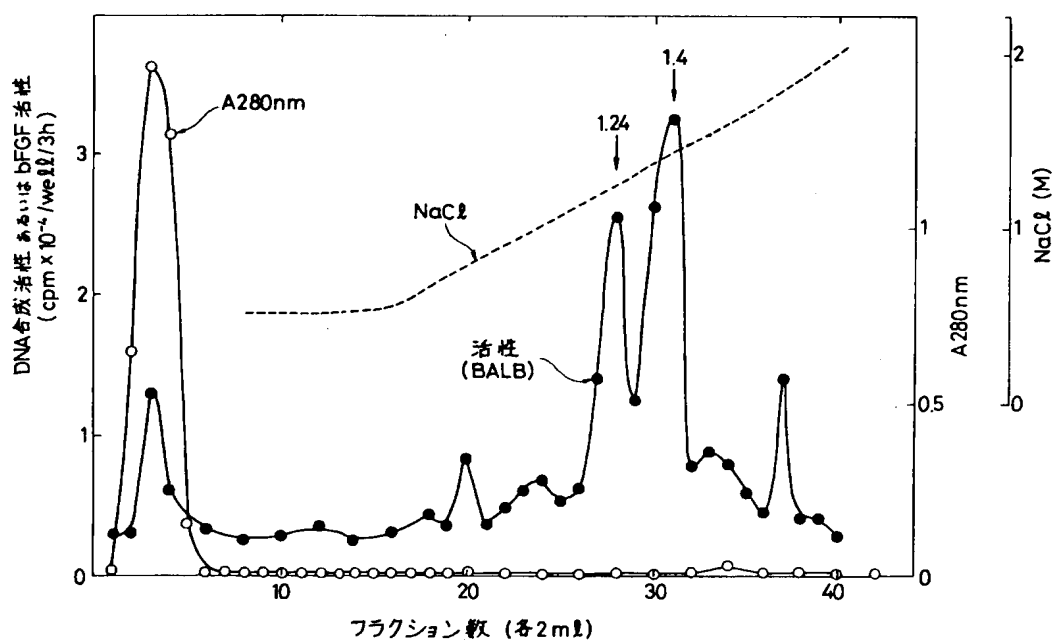
第 5 図



第 6 図



第 7 図



第 8 図

